

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, C07K 14/72, C12N 15/11, C12Q 1/68, C12N 5/10, G01N 33/74, C07K 14/575, A61K 38/22 | | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 95/22608 (43) Date de publication internationale: 24 août 1995 (24.08.95) |
| <p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00172</p> <p>(22) Date de dépôt international: 14 février 1995 (14.02.95)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 94/01808 17 février 1994 (17.02.94) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): AMIRANOFF, Brigitte [FR/FR]; 1, rue Jean-Raynal, F-91390 Morsang-sur-Orge (FR). HABERT-ORTOLI, Estelle [FR/FR]; 64, boulevard Voltaire, F-75011 Paris (FR). LOQUET, Isabelle [FR/FR]; 4, rue Paul-Bourget, F-92160 Antony (FR).</p> <p>(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).</p> | | <p>(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p> | |
| <p>(54) Title: GALANIN RECEPTOR, NUCLEIC ACIDS, TRANSFORMED CELLS AND USES THEREOF</p> <p>(54) Titre: RECEPTEUR GALANINE, ACIDES NUCLEIQUES, CELLULES TRANSFORMÉES ET UTILISATIONS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Polypeptides having galanin receptor activity, genetic material for expressing same, any recombinant cell expressing said polypeptides, and the use thereof, are disclosed.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne des polypeptides ayant une activité de récepteur galanine, le matériel génétique permettant leur expression, toute cellule recombinante exprimant ces polypeptides, et leur utilisation.</p> | | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|-----------------------------------------------|----|-----------------------|
| AT | Autriche | GB | Royaume-Uni | MR | Montagne |
| AU | Australie | GE | Géorgie | MW | Malawi |
| BB | Barbade | GN | Guinée | NE | Niger |
| BE | Belgique | GR | Grèce | NL | Pays-Bas |
| BF | Burkina Faso | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BG | Bulgarie | IE | Irlande | NZ | Nouvelle-Zélande |
| BJ | Bénin | IT | Italie | PL | Pologne |
| BR | Brésil | JP | Japon | PT | Portugal |
| BY | Biélorussie | KE | Kenya | RO | Roumanie |
| CA | Canada | KG | Kirghizistan | RU | Fédération de Russie |
| CF | République centrafricaine | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CG | Congo | KR | République de Corée | SE | Suède |
| CH | Suisse | KZ | Kazakhstan | SI | Slovénie |
| CI | Côte d'Ivoire | LI | Liechtenstein | SK | Slovaquie |
| CM | Cameroun | LK | Sri Lanka | SN | Sénégal |
| CN | Chine | LU | Luxembourg | TD | Tchad |
| CS | Tchécoslovaquie | LV | Lettone | TG | Togo |
| CZ | République tchèque | MC | Monaco | TJ | Tadjikistan |
| DE | Allemagne | MD | République de Moldova | TT | Trinité-et-Tobago |
| DK | Danemark | MG | Madagascar | UA | Ukraine |
| ES | Espagne | ML | Mali | US | Etats-Unis d'Amérique |
| FI | Finlande | MN | Mongolie | UZ | Ouzbékistan |
| FR | France | | | VN | Vietnam |
| GA | Gabon | | | | |

RECEPTEUR GALANINE, ACIDES NUCLEIQUES, CELLULES
TRANSFORMEES ET UTILISATIONS

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides et le matériel génétique permettant leur expression. Plus particulièrement, elle concerne de 5 nouveaux polypeptides ayant une activité de récepteur galanine.

La galanine est un neuropeptide ubiquitaire de 29 acides aminés chez les mammifères (30 chez l'homme) qui contrôle des fonctions biologiques variées : (i) sécrétions endocrines (insuline, somatostatine, glucagon, hormone de croissance ...), (ii) tonicité musculaire dans le tractus digestif, (iii) contrôle du comportement (prise 10 alimentaire, nociception, apprentissage, mémoire, douleur...) par effet neuro-modulateur au niveau du système nerveux central. Cette liste non exhaustive des effets de la galanine, mis en évidence le plus souvent chez l'animal, explique l'intérêt croissant des pharmacologues pour ce neuropeptide. Des molécules sélectives (agoniste ou antagoniste de la galanine) constitueraient des agents pharmacologiques 15 potentiels en endocrinologie, en neurologie et en psychiatrie (Bartfai et al., (1992) TIPS 13, 312-317).

L'étude du mécanisme d'action de la galanine montre qu'elle agit par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques. La caractérisation biochimique et moléculaire du récepteur (Chen et al., (1993) PNAS 90, 3845-3849, 20 Fisone et al., (1989) Eur. J. Biochem. 180, 269-276) indique qu'il appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Selon les tissus cibles, le peptide inhibe l'adénylate cyclase, diminue le calcium intracellulaire, bloque les canaux calciques voltage-dépendant ou active les canaux potassiques ATP sensibles. Des études de relations structure-activité, à l'aide de fragments C et N-terminaux de la 25 galanine et de peptides chimériques ont montré que, (1) quelque soit le tissu, aucune séquence partielle du peptide n'est suffisante pour obtenir une activité totale, (2) selon les tissus, les 2 premiers acides aminés N-terminaux et le domaine C-terminal 16-29 de la galanine ne sont pas toujours essentiels à son activité. Ces observations suggèrent l'existence de sous-types de récepteurs galaninergiques.

30 La présente invention décrit pour la première fois le clonage d'un gène codant pour un récepteur galaninergique humain. La présente invention décrit également pour la première fois la séquence de récepteurs galaninergiques et leur expression dans des cellules recombinantes. La présente invention permet ainsi une

meilleure compréhension de la structure des récepteurs galaninergiques, et d'étudier de manière plus fine leur mécanisme d'action. La présente invention permet également d'obtenir des récepteurs galaninergiques de très grande pureté et en quantité élevée, permettant la réalisation d'études fonctionnelles et pharmacologiques,

5 la fabrication d'anticorps, etc. L'invention permet aussi de préparer des fragments de récepteurs galaninergiques de taille définie, ainsi que toutes sortes de dérivés des récepteurs galaninergiques. L'invention fournit également des cellules recombinantes exprimant des récepteurs galaninergiques ou des fragments de récepteurs galaninergiques, utilisables pour le criblages de ligands de ces récepteurs (agonistes,

10 antagonistes, modulateurs, etc). Les séquences d'ADN de l'invention permettent également la réalisation de sondes, capables de détecter dans des échantillons biologiques toute irrégularité dans l'expression d'un récepteur galaninergique (non-expression, mutation, polymorphisme, etc). Ces sondes sont également utilisables pour le clonage par hybridation de tout autre ADNc codant pour un récepteur galaninergique, à partir de tissus d'origines diverses, comme indiqué plus loin.

15

Un premier objet de l'invention réside donc dans une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide ayant une activité de récepteur galaninergique. Au sens de l'invention, récepteur galaninergique comprend notamment tous les sous-types potentiels.

20 Plus préférentiellement, la séquence nucléotidique selon l'invention est choisie parmi :

- (a) tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID n°1 ou de son brin complémentaire,
- (b) toute séquence hybrideant avec une séquence (a) et codant pour un polypeptide ayant une activité de récepteur galaninergique, et,
- 25 (c) les séquences dérivées des séquences (a) et (b) en raison de la dégénérescence du code génétique.

30 Un mode de réalisation tout particulier de l'invention est représenté par une séquence nucléotidique comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID n°1 ou de son brin complémentaire.

Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences génomiques, d'ADNc, d'ARN, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces

séquences peuvent être obtenues par exemple par criblage de banques d'ADN (banque d'ADNc, banque d'ADN génomique) au moyen de sondes élaborées sur la base de la séquence SEQ ID n°1. De telles banques peuvent être préparées à partir de cellules de différentes origines par des techniques classiques de biologie moléculaire connues de l'homme du métier. Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, notamment selon la méthode des phosphoramidites, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques.

Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être utilisées pour la production des polypeptides galaninergiques. Le terme polypeptide galaninergique désigne tout polypeptide ayant une activité de récepteur galaninergique, et tout fragment ou dérivé d'un tel polypeptide. Pour la production de polypeptides galaninergiques, la partie codant pour ledit polypeptide est généralement placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire. Le choix de ces signaux (promoteurs, terminateurs, etc) peut varier en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent faire partie d'un vecteur, qui peut être à réPLICATION autonome ou intégratif. Plus particulièrement, des vecteurs à réPLICATION autonome peuvent être préparés en utilisant des séquences à réPLICATION autonome chez l'hôte choisi. S'agissant des vecteurs intégratifs, ceux-ci peuvent être préparés par exemple en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur. Les hôtes cellulaires utilisables pour la production des polypeptides galaninergiques de l'invention par voie recombinante sont aussi bien des hôtes eucaryotes que procaryotes. Parmi les hôtes eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, C127, NIH-3T3, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*.

Les séquences nucléotidiques de la présente invention sont également utilisables dans le domaine pharmaceutique, soit pour la réalisation de séquences antisens utilisables dans le cadre d'une thérapie génique, soit encore pour la réalisation de sondes permettant la détection, par des expériences d'hybridation, de

l'expression de récepteurs galaninergiques dans des échantillons biologiques et la mise en évidence d'anomalies génétiques (polymorphisme, mutations) ou d'expressions aberrantes.

L'inhibition de l'expression de certains gènes par des séquences antisens s'est avérée être une stratégie prometteuse dans le contrôle de l'activité d'un gène. Les 5 séquences antisens sont des séquences dont le produit de transcription est complémentaire du brin codant d'un gène donné, et est de ce fait capable d'hybrider spécifiquement avec l'ARNm transcrit ou avec le gène, inhibant sa transcription ou sa traduction en protéine. L'invention a ainsi pour objet les séquences antisens capables 10 d'inhiber au moins partiellement la production de polypeptides galaninergiques tels que définis précédemment. De telles séquences peuvent être constituées par tout ou partie des séquences nucléotidiques définies ci-avant. Il s'agit généralement de séquences ou de fragments de séquences complémentaires de séquences codant pour 15 des peptides de l'invention. De telles séquences peuvent être obtenues à partir de la séquence SEQ ID n°1, par fragmentation, etc, ou par synthèse chimique.

Comme indiqué ci-dessus, l'invention permet également la réalisation de sondes nucléotidiques, synthétiques ou non, capables de s'hybrider avec les séquences nucléotidiques définies ci-avant qui codent pour des polypeptides galaninergiques de l'invention, ou avec les ARNm correspondants. De telles sondes peuvent être utilisées 20 *in vitro* comme outil de diagnostic, pour la détection de l'expression d'un récepteur galaninergique, ou encore pour la mise en évidence d'anomalies génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations ponctuelles, etc). Compte tenu des activités multiples des ligands endogènes des récepteurs galaninergiques, les sondes de l'invention peuvent ainsi permettre d'identifier des affections neurologique, 25 cardiovasculaire, endocrinologique ou psychiatrique. Ces sondes peuvent également être utilisées pour la mise en évidence et l'isolement de séquences d'acides nucléiques homologues codant pour des polypeptides galaninergiques tels que définis précédemment, à partir d'autres sources cellulaires et préférentiellement de cellules d'origines humaines. Bien que la présente demande soit plus particulièrement illustrée 30 par un clone désigné GalR1, les études biochimiques et immunologiques décrites dans la littérature indiquent l'existence de sous-types de récepteurs galaninergiques. Les sondes de l'invention permettent d'isoler par des techniques connues de l'homme du métier (Cf exemple 4) ces différents sous-types. Les sondes de l'invention comportent généralement au moins 10 bases, et elles peuvent comporter jusqu'à

l'intégralité de la séquence SEQ ID n°1 ou de son brin complémentaire. Préférentiellement, ces sondes sont, préalablement à leur utilisation, marquées. Pour cela, différentes techniques connues de l'homme du métier peuvent être employées (marquage radioactif, enzymatique, etc). Les conditions d'hybridation dans lesquelles 5 ces sondes peuvent être utilisées sont indiquées dans les techniques générales de clonage ci-après ainsi que dans les exemples.

L'invention a également pour objet tout polypeptide résultant de l'expression d'une séquence nucléotidique telle que définie précédemment. Préférentiellement, il s'agit d'un polypeptide comprenant tout ou partie de la séquence peptidique SEQ ID 10 n° 1 ou d'un dérivé de celle-ci.

Au sens de la présente invention, le terme dérivé désigne toute molécule obtenue par modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence peptidique SEQ ID n° 1. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un 15 ou plusieurs résidus. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité du peptide pour son(ses) ligand(s), celui d'améliorer ses niveaux de production, celui d'augmenter sa résistance à des protéases, celui d'augmenter et/ou de modifier son activité, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et/ou biologiques. Parmi les dérivés 20 résultant d'une addition, on peut citer par exemple les polypeptides chimères comportant une partie hétérologue supplémentaire liée à une extrémité. Le terme dérivé comprend également les polypeptides homologues au polypeptide SEQ ID n° 1, issus d'autres sources cellulaires et notamment de cellules d'origine humaine, ou d'autres organismes, et possédant une activité de même type. De tels polypeptides 25 homologues comprennent notamment les différents sous-types de récepteurs galaninergiques. Ils peuvent être obtenus en particulier par des expériences d'hybridation comme décrit dans les exemples.

Préférentiellement, les polypeptides de l'invention sont des polypeptides possédant la capacité de lier la galanine ou un variant de la galanine. Toujours selon 30 un mode préféré, les polypeptides de l'invention sont susceptibles d'être reconnus par des anticorps reconnaissant la séquence peptidique SEQ ID n° 1 complète. De tels anticorps peuvent être générés par toute technique connue de l'homme du métier, en utilisant comme antigènes les polypeptides décrits dans la présente demande.

Comme indiqué dans les exemples, ces polypeptides peuvent être exprimés dans différents types cellulaires pour former des récepteurs galaninergiques fonctionnels.

Les polypeptides de l'invention peuvent être obtenus par expression dans un hôte cellulaire d'une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, par synthèse chimique, sur la base de la séquence SEQ ID n° 1 en utilisant les techniques connues de l'homme du métier, ou par une combinaison de ces techniques.

Un autre objet de l'invention concerne les cellules recombinées capables d'exprimer à leur surface un polypeptide ayant une activité de récepteur galaninergique. Ces cellules peuvent être obtenues par introduction d'une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, puis culture desdites cellules dans des conditions d'expression de ladite séquence.

Les cellules recombinées selon l'invention peuvent être aussi bien des cellules eucaryotes que procaryotes. Parmi les cellules eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, CI27, NIH-3T3, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme cellules procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*. Les cellules ainsi obtenues peuvent être utilisées pour mesurer la capacité de différentes molécules à se comporter comme ligand ou comme modulateur de l'activité des récepteurs galaninergiques. Plus particulièrement, elles peuvent ainsi être utilisées dans un procédé de mise en évidence et d'isolement de ligands ou de modulateur de l'activité des récepteurs galaninergiques, et, plus préférentiellement, d'agonistes et d'antagonistes.

Un autre objet de l'invention concerne donc un procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de ligands des récepteurs galaninergiques, selon lequel on réalise les étapes suivantes :

- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée telle que décrite ci-dessus exprimant à sa surface un polypeptide ayant une activité de récepteur galaninergique dans des conditions permettant l'interaction entre ledit

polypeptide et ladite molécule dans le cas où celle-ci possèderait une affinité pour ledit polypeptide, et,

- on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide.

Dans un mode particulier, ce procédé de l'invention est adapté à la mise en évidence et/ou l'isolement d'agonistes et d'antagonistes de la galanine pour les récepteurs galaninergiques.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de modulateurs des récepteurs galaninergiques, selon lequel on réalise les étapes suivantes :

- 10 - on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée telle que décrite ci-dessus exprimant à sa surface un polypeptide ayant une activité de récepteur galaninergique, en présence du ligand endogène dudit récepteur, dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et son ligand, et,
- 15 - on détecte et/ou isole les molécules capables de moduler l'activité du ligand sur ledit polypeptide.

Dans un mode particulier, ce procédé de l'invention est adapté à la mise en évidence et/ou l'isolement de modulateurs de l'activité de la galanine sur les récepteurs galaninergiques.

- 20 Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand ou d'un modulateur identifié et/ou obtenu selon le procédé décrit ci-avant comme médicament. De tels ligands ou modulateurs peuvent en effet permettre de traiter certaines affections liées aux récepteurs galaninergiques. En particulier, les récepteurs galaninergiques étant les médiateurs d'un effet analgésique, les agonistes de ces récepteurs peuvent être utilisés pour diminuer les sensations de douleur. D'autres activités des récepteurs galaninergiques ont été mentionnées en introduction.
- 25

L'invention concerne également tout médicament comprenant comme principe actif au moins une molécule agissant sur un récepteur de l'invention. Préférentiellement la molécule est un ligand ou un modulateur identifié et/ou isolé selon le procédé décrit précédemment.

D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

5 Figure 1: Saturation des récepteurs à la galanine par la galanine de porc, sur les membranes de cellules Cos1 transfectées par le clone GalR1. L'encart représente la transformation de Scatchard des données de la courbe de liaison (Les valeurs présentées correspondent à une expérience représentative où chaque point a été déterminé en triplicat).

10 Figure 2: Déplacements par des peptides de la liaison spécifique de la (¹²⁵I)-galanine aux membranes de cellules Cos1 transfectées par le clone GalR1 (Les valeurs présentées correspondent à une expérience représentative où chaque point a été déterminé en triplicat).

15 Figure 3: Inhibition par la galanine de la stimulation de la production d'AMPc dans des cellules Cos1 transfectées par le clone GALR1 (Les valeurs présentées correspondent à une expérience représentative où chaque point a été déterminé en duplicitat).

15 Techniques générales de clonage

20 Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césum, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extractions de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc, sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

25 Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 selon les recommandations du fournisseur.

30 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes est effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E.coli* selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 utilisée selon les recommandations du fabricant. La

destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 5 (1985) 8749-8764].

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354 ; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350].

La vérification des séquences nucléotidiques est effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467].

Pour les expériences d'hybridation, les conditions de stringence sont basées sur Maniatis T. et al., précitée.

1. Isolement du récepteur humain à la galanine

Cet exemple décrit l'isolement du clone GalRI codant pour le récepteur à la galanine humain par criblage par expression d'une banque d'ADNc.

1a. Construction de la banque

Une banque d'ADNc a été réalisée à partir de la lignée mélanocytaire humaine Bowes (ATCC CRL 9607), en utilisant le vecteur d'expression transitoire de mammifère pcDNA1. Après extraction des ARN totaux, les ARN polyA⁺ sont purifiés sur colonne d'oligodT cellulose. La synthèse d'ADNc est effectuée en présence d'un mélange d'amorces (oligodT et oligonucléotides s'hybridant au hasard). Après un fractionnement par la taille (>1100 paires de bases), la banque a été construite par ligature des cDNA dans le vecteur pcDNA1 (sites de clonage BstX1) et transformation dans *E. Coli* (MC 1061/P3). 10⁶ clones indépendants ont été obtenus et amplifiés. Environ 720000 clones bactériens ont alors été cultivés en milieu solide sélectif à une densité de 8000 colonies par boîte. 90 lots d'ADN plasmidique, correspondant chacun à 8000 colonies, ont été préparés par lyse alcaline.

1b. Transfection

L'ADN plasmidique de chaque lot a été transfecté indépendamment dans les cellules Cos1 (ATCC CRL 1650) par électroporation selon le protocole suivant: 32 mg d'ADN, 8 10⁶ cellules dans 500 ml de milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal, 6 mM de glutamine,

100UI/ml de pénicilline et 100 mg/ml de streptomycine sous 5 % de CO₂, 960 mFarad, 250 Volts, électroporateur Biorad. Après électroporation, les cellules ont été cultivées en monocouche dans des boites de culture (Nunc) de 16 cm de diamètre pendant 72 heures. Dans ces conditions, une moyenne de 30 % de cellules sont
5 transfectées.

1c. Criblage par expression

Les cellules transfectées ont été testées pour leur capacité à lier la (¹²⁵I)-galanine. 48 heures après la transfection, les cellules ont été changées. Le jour de la liaison, elles sont mises en présence de DMEM pendant 1 heure, puis lavées par
10 10 ml de tampon 1 (Tris HCl 25 mM pH: 7,5, MgCl₂ 10mM, BSA 2 %). Les cellules
ont alors été incubées pendant 5 heures à 20°C en présence de tampon 2 (tampon 1
contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases: 10 mg/ml d' aprotinine, 1mg/ ml de
bacitracine, 10 mg/ml de pepstatine A et 10⁻⁵M de phénylméthylsulfonylfluoride)
15 contenant 10⁻¹⁰M de (¹²⁵I)-galanine (NEN, galanine 1-29 de porc, AS: 2200
curie/mmol). Après lavage (5x15 ml de tampon 1), les boîtes ont été séchées et
exposées en autoradiographie (film Amersham hyperscreen MP) pendant 15 jours à
-80°C.

1d. Isolement du clone GalR1 codant pour le récepteur à la galanine

Sur les 720000 clones bactériens testés, un lot de 8000 colonies, donnant un
20 signal spécifique en autoradiographie (i.e (i) dépassant le bruit de fond, (ii)
disparaisant en présence de 10⁻⁶ M de galanine froide) a été identifié. Ce lot a
ensuite été divisé en 48 lots de 700 clones chacun. Après transfection, les cellules ont
été testées pour leur capacité à lier la (¹²⁵I)-galanine. Trois lots produisent un signal
spécifique en autoradiographie. L'un d'eux a été sous-divisé 2 fois (25 lots de 30
25 clones puis 60 clones individuels), conduisant à 2 clones conférant aux cellules Cos1
une forte capacité à lier de la (¹²⁵I)-galanine.

2. Etude structurale du récepteur à la galanine

Les 2 clones isolés dans l'exemple 1 contiennent un insert identique de 3,1 kb.
La séquence d'un des 2 clones a été déterminée sur les 2 brins, par la technique
30 fluorescente (Applied Biosystems) dérivée de la méthode de Sanger, en utilisant la
Taq Polymérase et des didéoxynucléotides fluorescents.

La séquence obtenue correspond à la séquence SEQ ID n°1. Elle porte une phase ouverte de lecture de 1053 paires de bases: le site d'initiation de la traduction est attribué au codon ATG en position 787 de la séquence SEQ ID n°1.

La phase ouverte de lecture ainsi définie code pour un protéine de 349 acides aminés (SEQ ID n°1) de poids moléculaire calculé de 38897 Daltons. L'analyse du profil d'hydrophobicité de la séquence en acides aminés suggère que le récepteur possède 7 segments constitués d'acides aminés majoritairement hydrophobes, formant globalement des segments transmembranaires (STM), point commun aux membres de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Le récepteur est organisé comme suit: MET1-ASN33, segment N-terminal; PHE34-LEU58, STM I ; ALA59-ASN71, boucle intracellulaire I ; LEU72-LEU98, STM II ; PRO99-LYS109, boucle extracellulaire I ; PHE110-ASP132, STM III ; ARG133-ASN151, boucle intracellulaire II ; ALA152-VAL170, STM IV ; ALA171-ALA199, boucle extracellulaire II ; TYR200-VAL223, STM V ; LEU224-LYS244, boucle intracellulaire III ; THR245-LEU268, STM VI ; TRP269-PRO279, boucle extracellulaire III ; ALA280-SER307, STM VII ; GLU308-VAL349, segment C-terminal.

De plus, certains acides aminés conservés au sein des membres de la famille des récepteurs couplés aux protéines G sont présents dans la séquence protéique du récepteur GALR1. En particulier, on note (1) 2 sites de N-glycosylation (ASN7 et ASN12), (2) 1 site de phosphorylation par la protéine kinase cAMP ou cGMP dépendante (SER143), (3) 1 site de farnésylation (CYS340), (4) 2 cystéines (CYS187 et 308), (5) 4 prolines (PRO169,212,262 et 300), (6) le motif GLY ASN X X VAL (50-54), (7) le motif ASP ARG TYR (132-134), (8) le motif ASN PRO ILE X TYR (299-303).

La séquence de la protéine de la présente invention a finalement été comparée avec les séquences des protéines de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (banque de données Swissprot data). L'homologie la plus importante (33,8 %, incluant 3 brèches) est observée avec le récepteur à la somatostatine de type 4.

3. Etudes biochimiques du récepteur GalR1 exprimé transitoirement dans les cellules Cos1

3a. Stoichiométrie et pharmacologie du récepteur GalR1

L'ADN plasmidique du clone GalR1 a été préparé par les techniques de biologie moléculaire classiques pour transférer des cellules Cos1. Les membranes

des cellules transfectées ont ensuite été utilisées pour estimer les paramètres de liaison à l'équilibre de la galanine 1-29 et de fragments de galanine.

L'ADN plasmidique (90 mg/8 10⁶ cellules Cos1) a été transfecté par électroporation comme décrit précédemment (1b). 72 heures après la transfection, les 5 cellules recombinantes ont été récoltées et sédimentées. Les membranes ont alors été préparées comme suit : à 4°C, le culot cellulaire est mis en présence de 10 ml de tampon 3 (Hepes 5 mM, pH 7,5) pendant 20 minutes ; après centrifugation à 13 000 g pendant 15 minutes, le culot est resuspendu dans le tampon 3 et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

10 Des expériences de liaison à l'équilibre (saturation et compétition) ont été réalisées sur les membranes en présence de (¹²⁵I)-galanine et de différents peptides dans les conditions expérimentales suivantes : les membranes (10 mg de protéine) ont été incubées pendant 30 minutes à 20°C avec 5 10⁻¹¹M de (¹²⁵I)-galanine en absence ou en présence de concentrations croissantes de galanine 1-29, galanine 2-29, 15 galanine 3-29 ou galanine 1-16 (10⁻¹¹M-10⁻⁶M) dans un volume final de 0,25 ml de tampon 2 (1c). La réaction a ensuite été stoppée par addition de 0,25 ml de tampon 1 (1c) et centrifugation pendant 15 minutes à 13000 g. Le culot obtenu a été lavé trois fois avec 0,2 ml de tampon Tris 25 mM (pH: 7,5) glacé contenant 10 % de sucre, puis la radioactivité a été mesurée avec un compteur à scintillation gamma. La liaison non spécifique est mesurée en présence de 10⁻⁷ M de galanine 1-29 de porc. Les 20 valeurs des constantes d'affinité (Ki) ont été obtenues en suivant l'équation de Cheng et Prussoff: $Ki = IC50 / (1 + L/Kd)$.

Dans les conditions expérimentales ci-dessus décrites, les résultats suivants 25 sont observés : contrairement aux cellules Cos1 non transfectées, ou transfectées par un plasmide contrôle, les cellules Cos1 transfectées par le clone GalR1 présentent une liaison spécifique de la galanine iodée. L'analyse des résultats par la méthode de Scatchard montre l'existence d'une seule classe de sites de haute affinité, avec une constante de dissociation apparente (Kd) = 0,8 nM et de haute capacité, avec un nombre maximal de sites de fixation (Bmax) = 2,8 pmoles/mg protéines. Compte tenu de l'efficacité de transfection (environ 30 %, 1b), le niveau d'expression de 30 récepteurs galaninergiques de l'invention dans les cellules Cos1 est estimé à 5 10⁵ sites/cellule.

Les galanines de rat, de porc et humaine inhibent de façon compétitive la liaison de la (¹²⁵I)-Galanine aux membranes des cellules transfectées avec un Ki = 35 0,3, 0,2 et 0,8 nM respectivement. La galanine 2-29 (Ki= 115 nM) et la galanine 1-16

($K_i = 5$ nM) inhibent compétitivement la liaison de la (^{125}I)-galanine avec une affinité plus faible que la galanine 1-29. Ce clone n'a pas d'affinité pour la galanine 3-29.

L'ordre d'efficacité de ces différentes molécules confirme la spécificité du récepteur GalR1 comme récepteur galaninergique. Ces résultats montrent par ailleurs que les cellules Cos1 de la présente invention sont capables d'exprimer le récepteur à la galanine ayant des caractéristiques de liaison comparables à celles du récepteur natif.

3b. Etude fonctionnelle du récepteur GalR1

Le couplage du récepteur Galanine à l'adénylate cyclase a été estimé par la capacité de la galanine à inhiber la production d'AMPc dans les cellules Cos1 transfectées par le clone GalR1. Pour cette étude, 10^5 cellules transfectées dans les conditions décrites ci-dessus ont été ensemencées dans des plaques de culture multipuits (1,5 cm de diamètre) et les expériences d'AMPc ont été réalisées 72 heures après la transfection (le milieu de culture est renouvelé la veille de l'expérience).
Après une préincubation de 1 heure à 37°C en milieu DMEM, les cellules ont été lavées par du DMEM contenant 2 % de BSA. Elles ont alors été incubées 30 minutes à 37°C dans ce même milieu contenant $2 \cdot 10^{-4}$ M d'isobutylmethylxanthine, en absence et en présence de forskoline (10^{-4} M) et/ou de galanine humaine (10^{-11} M- 10^{-6} M). Après trois lavages des cellules en milieu DMEM, l'AMPc intracellulaire est extrait par addition d'éthanol 70 %. Après lyophilisation, l'AMPc est mesuré par radioimmunoanalyse (Kit AMPc, Amersham).

Les résultats montrent que dans les cellules Cos1 transfectées par le clone GalR1, la galanine inhibe fortement la production d'AMPc intracellulaire induite par la forskoline (la production induite est de l'ordre de 2 pmoles/10⁵ cellules, soit 10 fois le basal). Cet effet n'est pas observé dans des conditions basales. La demi-inhibition et l'inhibition maximale de la production d'AMPc sont induites par 10⁻⁹M et 10⁻⁶M de galanine humaine, respectivement. En présence de 10⁻⁶M de galanine, la production d'AMPc intracellulaire induite par la forskoline est diminuée de 50 %.

30 L'inhibition par la galanine de la production d'AMPc intracellulaire induite par la forskoline confirme la spécificité du récepteur GalR1 comme récepteur galaninergique. Ces résultats montrent par ailleurs que les cellules Cos1 de la

présente invention sont capables d'exprimer le récepteur à la galanine ayant des caractéristiques fonctionnelles comparables à celles du récepteur natif.

4. Recherches de séquences homologues, notamment de sous-types, dans d'autres tissus

5 Cet exemple montre que la séquence nucléotidique SEQ ID n°1 ou des fragments de celle-ci peuvent être utilisés pour la mise en évidence de séquences homologues, notamment de sous-types, à partir d'autres tissus. Pour cela, différentes techniques sont utilisables, telles que la PCR, l' hybridation *in situ*, le transfert de Northern, etc...

10 Plus particulièrement, pour la recherche par PCR, les ARN totaux des différents tissus étudiés sont préparés, puis soumis à réverse transcription et à une amplification, en présence de transcriptase réverse, de Taq polymérase et des amorces dérivées de la séquence SEQ ID n°1 appropriées. Les produits ainsi obtenus sont ensuite transférés sur filtres de nitrocellulose et hybridés dans des conditions de
15 stringence variables.

Les séquences homologues mises en évidence lors de ces expériences peuvent être ensuite isolées et/ou amplifiées par les techniques classiques de biologie moléculaire.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

5

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
 (B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
 (C) VILLE: ANTONY
 10 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 92165

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Recepteur Galanine, acides nucléiques, cellules transformées et utilisations.

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 1

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

25 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 3083 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 30 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

35 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
 40 (A) ORGANISME: Homo sapiens

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 787..1836
 45 (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "recepteur galanine humain"

50 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ATTCGGCGGC GACCCATCCC GCTAGAACCTC STCCAGTCTC TGCTCGCGCA CCGTGACTTC | 60 |
| TAAGGGCGGC GGATTTCACC CGAGCTGTTT TCGCCTCTCA GTTGCAGCAG AGAAGCCCCCT | 120 |
| 55 GGCACCCGAC TCTATCCACC ACCAGGAAGC CTCCAAAAG AGCTCTGCC CTGTGGACGA | 180 |
| CTCGGAATCC CTGGAAAAGC CGGGAGGGAG TCGGAGGCAG CAGCCCAGTG GGGAGGTGGC | 240 |
| 60 GCTGGGCGCG CGGGATGCAG CGGGAGCCTT CTCTGCAGGA GCCGCACAGT GCACTGCTGC | 300 |
| GCGCTGGGCA GTGCAGGGAA GCGCCGCGGG AAGGAGCGGC TCCGAGCAAC AGGTGCAGCA | 360 |
| CGCAGCCGCT CGGGAGCCA GGGAA A CCG CGGGCGAAGA TCTGGAGCGG TAAGGCGGAG | 420 |

| | | |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| | AGAAGGGTCT TTCCACCTGC CGGGCTGCAG CGGCCGGATC CCTCTTCCTCA GGCTCCGTGS | 480 |
| 5 | TCGCGCAGCG GCGGGAGGCG CCCGGGCAGG GGACCCCAGT GCTCTCGAGA TCACCGTCCC | 540 |
| | TTCCCGAGAA GGTCCAGCTC CGGGCTCCCG AACCCACCCCT CTCTCAGAAC GTCGCGGCC | 600 |
| | AAAGACGGTG CCACCAGGCA CGGCCACCGG ATCCCCGCTC CGCCTGGCTC GCGCCTCGGG | 660 |
| 10 | GGAAGCTCAG ACTCCTAAC TCGCACTCTC CGTGCTTTGC GCCGGGACCC CTGGCCACCC | 720 |
| | CGGGCGCTG CTATCCCGCC CTCCCTCCCG CGCGCTCCGC CGCTCGCCGG GACAGCCCCG | 780 |
| 15 | CGGGCCC ATG CAG CTG GCG GTC GGG AAC CTC AGC GAG GGC AAC GCG AGC Met Glu Leu Ala Val Gly Asn Leu Ser Glu Gly Asn Ala Ser | 828 |
| | 1 5 10 | |
| 20 | TGT CCG GAG CCC CCC GCC CCG GAG CCC GGG CCG CTG TTC GGC ATC GGC Cys Pro Glu Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Leu Phe Gly Ile Gly 15 20 25 30 | 876 |
| | GTG GAG AAC TTC GTC ACG CTG GTG GTG TTC GGC CTG ATC TTC GCG CTG Val Glu Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Leu 35 40 45 | 924 |
| 25 | GGC GTG CTG GGC AAC AGC CTA GTG ATC ACC GTG CTG GCG CGC AGC AAG Gly Val Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys 50 55 60 | 972 |
| 30 | CCG GGC AAG CCG CGG AGC ACC ACC AAC CTG TTC ATC CTC AAC CTG AGC Pro Gly Lys Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser 65 70 75 | 1020 |
| 35 | ATC GCC GAC CTG GCC TAC CTG CTC TTC TGC ATC CCC TTC CAG GCC ACC Ile Ala Asp Leu Ala Tyr Leu Leu Phe Cys Ile Pro Phe Cln Ala Thr 80 85 90 | 1068 |
| 40 | GTG TAC GCG CTG CCC ACC TGG GTG CTG GGC GCC TTC ATC TGC AAG TTC Val Tyr Ala Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe 95 100 105 110 | 1116 |
| | ATC CAC TAC TTC TTC ACC GTG TCC ATG CTG GTG AGC ATC TTC ACC CTG Ile His Tyr Phe Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ile Phe Thr Leu 115 120 125 | 1164 |
| 45 | GCC GCG ATG TCC GTG GAC CGC TAC GTG GCC ATC GTG CAC TCG CGG CGC Ala Ala Met Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val His Ser Arg Arg 130 135 140 | 1212 |
| 50 | TCC TCC TCC CTC AGG GTG TCC CGC AAC GCG CTG CTG GGC GTG GGC TGC Ser Ser Leu Arg Val Ser Arg Asn Ala Leu Leu Gly Val Gly Cys 145 150 155 | 1260 |
| 55 | ATC TGG GCG CTG TCC ATT GCC ATG GCC TCG CCC GTG GCC TAC CAC CAG Ile Trp Ala Leu Ser Ile Ala Met Ala Ser Pro Val Ala Tyr His Gln 160 165 170 | 1308 |
| | GGC CTC TTC CAC CCG CGC AGC AAC CAG ACC TTC TGC TGG GAC CAG Gly Leu Phe His Pro Arg Ala Ser Asn Gln Thr Phe Cys Trp Glu Gln 175 180 185 190 | 1356 |
| 60 | TGG CCC GAC CCT CGC CAC AAG AAG GCC TAC GTG GTG TGC ACC TTC GTC Trp Pro Asp Pro Arg His Lys Lys Ala Tyr Val Val Cys Thr Phe Val | 1404 |

| | 195 | 200 | 205 | |
|----|-------------|------------|--------------|------|
| | TTC | GCC | TAC | 1452 |
| | CTG | CTG | CCG | |
| | CTC | CTG | CTC | |
| | ATC | TGC | TTC | |
| | Leu | Ile | Cys | |
| 5 | Phe | Gly | Tyr | |
| | Leu | Leu | Pro | |
| | Leu | Leu | Leu | |
| | Leu | Ile | Cys | |
| | 210 | 215 | 220 | |
| | TTC | CTT | AAT | 1500 |
| | GGT | CAC | TTG | |
| | CAT | AAA | AAG | |
| | TTG | AAG | AAC | |
| | ATG | TCA | AAG | |
| | Leu | Lys | Cys | |
| | Asn | His | Leu | |
| | His | Lys | Lys | |
| | 225 | 230 | 235 | |
| 10 | GAA | GCA | TCC | 1548 |
| | AAG | AAA | AAG | |
| | ACT | GCA | CAG | |
| | GCA | ACA | ACA | |
| | GTT | CTG | GTG | |
| | Leu | Val | Val | |
| | Val | Val | Val | |
| | Val | Val | Val | |
| | 240 | 245 | 250 | |
| 15 | GTC | TTT | GGA | 1596 |
| | ATC | TCC | TGG | |
| | CTG | CCG | CAC | |
| | CAC | CAC | ATC | |
| | ATC | ATC | CAT | |
| | CAT | CTC | TGG | |
| | Val | Phe | Gly | |
| | Ile | Ser | Trp | |
| | Trp | Leu | Pro | |
| | Leu | His | His | |
| | 255 | 260 | 265 | 270 |
| 20 | GAG | TTT | GGA | 1644 |
| | GTT | TTC | CCG | |
| | CTG | ACG | CCG | |
| | GCT | TCC | TTC | |
| | TTC | CTC | TTC | |
| | AGA | ATC | | |
| | Glu | Phe | Gly | |
| | Val | Phe | Pro | |
| | Thr | Leu | Thr | |
| | Pro | Ala | Pro | |
| | 275 | 280 | 285 | |
| 25 | ACC | GCC | CAC | 1692 |
| | TGC | CTG | GCG | |
| | TAC | AGC | AAT | |
| | TCC | TCC | GTC | |
| | GTC | AAT | CCT | |
| | ATC | CAT | ATC | |
| | ATT | ATT | ATT | |
| | Thr | Ala | His | |
| | His | Cys | Leu | |
| | 290 | 295 | 300 | |
| 30 | TAT | GCA | TTT | 1740 |
| | CTC | TCT | GAA | |
| | AAT | TTC | AGG | |
| | AAG | GCC | TAT | |
| | TAA | CAA | AAA | |
| | GTG | TTC | TTC | |
| | TTC | TTG | TTG | |
| | Tyr | Ala | Phe | |
| | Phe | Leu | Ser | |
| | 305 | 310 | 315 | |
| 35 | AAG | TGT | CAC | 1788 |
| | ATT | CGC | AAA | |
| | CGC | CAT | GAT | |
| | AAT | TCA | ACT | |
| | AAA | CAC | AAA | |
| | CTG | GTG | GAA | |
| | AGT | AGT | AAT | |
| | 320 | 325 | 330 | |
| 40 | AAA | AGT | CGA | 1836 |
| | CGA | ATA | GAC | |
| | ACC | CCA | CCA | |
| | CCA | TCA | ACC | |
| | AAT | AAT | AAT | |
| | TGT | TGT | TGT | |
| | TTC | TTC | TTC | |
| | TTC | Asp | Ser | |
| | 335 | 340 | 345 | 350 |
| 45 | TAAAAAGATAG | AGTATCCTTA | TGGTTGAGTT | 1896 |
| | ACAGAAATGAG | CTAGTAAGCG | ATGCTGCAAC | 1956 |
| | TAATTAAATC | CCACGTGTGT | TAAAAAGTAC | 2016 |
| | GTGAGAATTA | TTTTCAATT | TTATTTAGT | 2076 |
| | TGCTGTACAG | TTTTATTCT | CTTCACACAT | 2136 |
| | TTCAACTCTT | CATAGATTGT | GAGCTGGCCC | 2196 |
| | CATTTAAAG | CCAATTATT | ATCAATATGG | 2256 |
| | AACTAATATT | TAGAAAAAAA | TCAGGAATAT | |
| | TTGGCCATTT | ATCTATTAAG | GTTCAGTCTGAA | 2316 |
| | ACAGGTGGCA | TTTGCTTCCA | GTCTGTTGC | 2376 |
| | GAGATACAGT | CGGTTTACCT | GGCAGAG | 2436 |
| | GTAGTAGGCA | CTGTTGATTC | CTTGGTGAC | 2496 |
| | CAGACTCAGA | AAATTATCC | CTGGGATGCA | |
| | TTAACACGTGG | TGTGAAACTG | GTAAACAAAA | 2556 |
| | AAGACTGTC | GCTTATAGA | TTAACACAAAA | |
| | TTAACACGTGG | AAGATGCCAA | TAACCTTTTG | 2616 |

| | | |
|----|---------------------------------------------------------------------|------|
| | TGGATTTGA AATTTTACAT TAGTACTTGA CAAAAGTTT CATTTCGCCT TGAATGGAAC | 2676 |
| 5 | CTACTAAAAA GAGAGATGAA AAAAAATCAG CGAGGTTGAT GTAGATAATA ATTTCTATGG | 2736 |
| | GACCAAAAGAC TAGACAGAAT TCAGTAAGTC ACATGAAGTA ATGGTCATGC CTGTACATAA | 2796 |
| | AGCATATTTG ATGTTTGATT TAGATGACAT TCAAAAAAAAA TCATGGGACT GAATATAACCT | 2856 |
| 10 | GGGGTATCCT ATCTTGTACA AATGCATGCT TTTTCATTAA ATTTGTAATG ATGTTAATG | 2916 |
| | AACATTTCCA CCAAACATTA TTTCCTCTAA AAATGTTAAT TTGGGGTTAA AACCATCACCC | 2976 |
| 15 | ATTTGAATT CAAATGTAGT TTTCATGACA ATTTTATATT GGATGTGTGT TTACAATGAG | 3036 |
| | AAAATGGCAT GAAAATATTA AATTGTCTTG TATCGGAAAAA GGAATTG | 3083 |

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide ayant une activité de récepteur galaninergique.

5 2. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle code pour un récepteur galaninergique humain.

3. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :

(a) tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire,

10 (b) toute séquence hybride avec une séquence (a) et codant pour un polypeptide ayant une activité de récepteur galaninergique, et,

(c) les séquences dérivées des séquences (a) et (b) en raison de la dégénérescence du code génétique.

15 4. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire.

5. Séquence nucléotidique selon les revendications 1 à 4 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les séquences d'ADN génomique, d'ADNc, d'ARN, les séquences hybrides ou les séquences synthétiques ou semi-synthétiques.

20 6. Séquence selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisée en ce que la partie codant pour ledit polypeptide est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire.

7. Polypeptide résultant de l'expression d'une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications précédentes.

25 8. Polypeptide comprenant tout ou partie de la séquence peptidique SEQ ID n° 1 ou d'un dérivé de celle-ci.

9. Séquence antisens capable d'inhiber au moins partiellement la production d'un polypeptide selon l'une des revendications 7 ou 8.

10. Sonde nucléotidique capable de s'hydrider avec une séquence selon la revendication 3 ou avec l'ARNm correspondant.

11. Utilisation d'une sonde selon la revendication 10 pour la détection de l'expression d'un récepteur galaninergique; ou pour la mise en évidence d'anomalies génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations ponctuelles, etc) ; ou pour identifier des affections neurologique, cardiovasculaire, endocrinologique ou psychiatrique comme étant liées aux récepteurs galaninergiques; ou encore pour la mise en évidence et l'isolement de séquences d'acides nucléiques homologues codant pour des polypeptides galaninergiques.

12. Polypeptide selon les revendications 7 ou 8 caractérisé en ce qu'il possède une activité de récepteur galaninergique.

10 13. Cellule recombinée capable d'exprimer à sa surface un polypeptide selon l'une des revendications 7, 8 ou 12.

14. Cellule selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les cellules eucaryotes ou procaryotes.

15 15. Procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de ligands des récepteurs galaninergiques, caractérisé en ce que l'on réalise les étapes suivantes :

- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée selon la revendication 13 exprimant à sa surface un polypeptide galaninergique, dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et ladite molécule dans le cas où celle-ci possèderait une affinité pour ledit polypeptide, et,
20 - on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide.

16. Procédé selon la revendication 15 pour la mise en évidence et/ou l'isolement d'agonistes et/ou d'antagonistes des récepteurs galaninergiques.

25 17. Procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de modulateurs des récepteurs galaninergiques, caractérisé en ce que l'on réalise les étapes suivantes :

- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée selon la revendication 13 exprimant à sa surface un polypeptide ayant une activité de récepteur galaninergique, en présence d'un ligand dudit récepteur, dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et le ligand, et,
30

- on détecte et/ou isole les molécules capables de moduler l'activité du ligand sur ledit polypeptide.

18. Ligand ou modulateur d'un polypeptide tel que défini dans les revendications 7, 8 et 12, susceptible d'être obtenu selon les procédés des
5 revendications 15 à 17.

19. Médicament comprenant comme principe actif au moins une molécule agissant sur un polypeptide selon la revendication 12.

20. Médicament selon la revendication 19 caractérisé en ce que la molécule est un ligand ou un modulateur identifié et/ou isolé selon le procédé des
10 revendications 15 à 17.

2/3

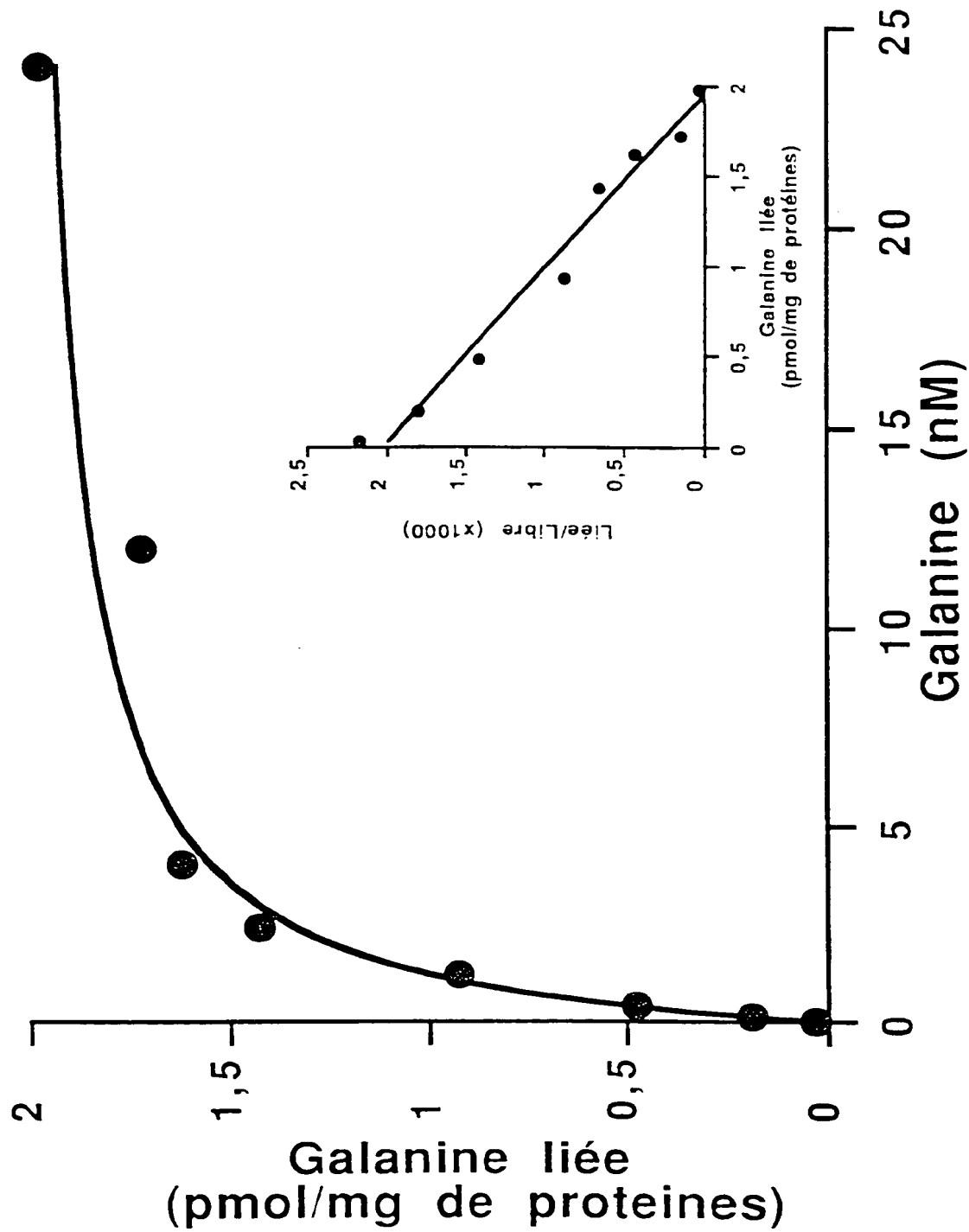


FIGURE 1

2/3

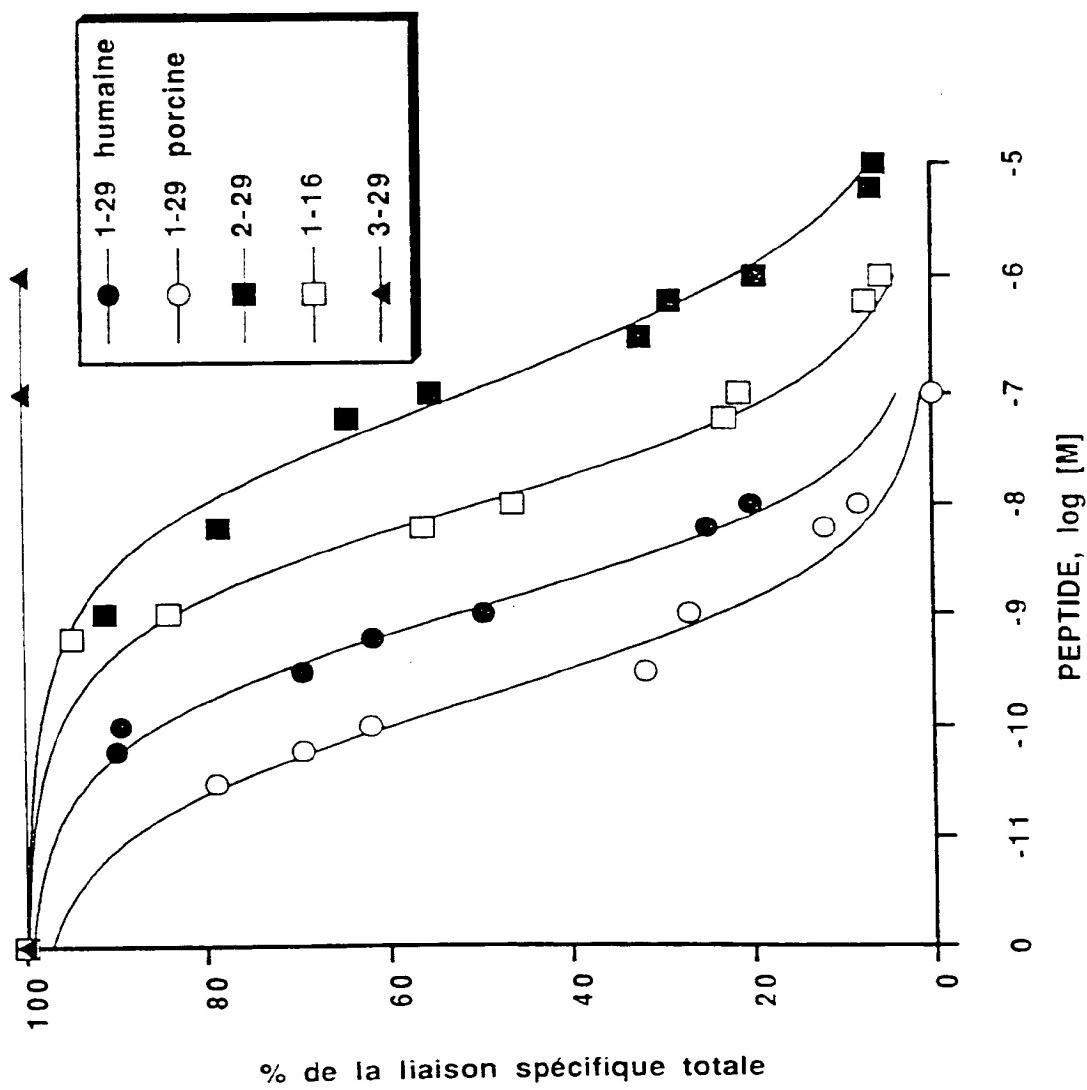


FIGURE 2

3/3

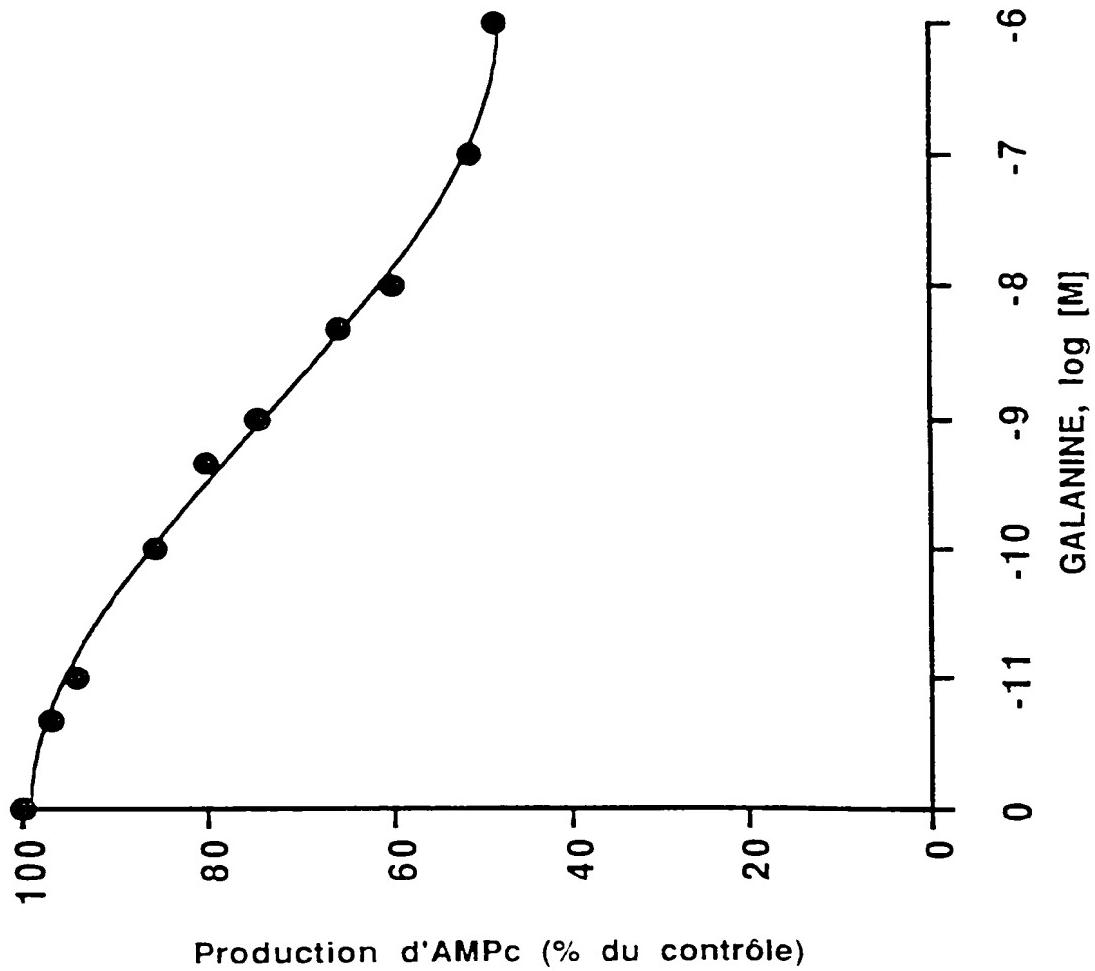


FIGURE 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/72 C12N15/11 C12Q1/68 C12N5/10
G01N33/74 C07K14/575 A61K38/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K C12Q G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X | EP,A,0 514 361 (AKTIEBOLAGET ASTRA) 19 November 1992 see claims --- | 15-20 |
| X | WO,A,92 15015 (ZYMOGENETIC, INC. & THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIV. OF WASHINGTON) 3 September 1992 see claims --- | 15-18 |
| X | BRAIN RESEARCH, vol.625, no.1, 15 October 1993, AMSTERDAM, PAYS BAS pages 173 - 176 A. HULTING ET AL. 'Galanin receptors from human pituitary tumors assayed with human galanin as ligand.' see the whole document --- | 15-18 -/- |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

'&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

10 May 1995

19.05.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/FR 95/00172

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol.90, no.23, 1 December 1993, WASHINGTON DC, ÉTATS UNIS pages 11287 - 11291 T. BARTFAI ET AL. 'Galanin-receptor ligand M40 peptide distinguishes between putative galanin-receptor subtypes.' see abstract --- | 15-18 |
| A | BAILLIÈRE'S CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, vol.8, no.1, January 1994, LONDRES, GRANDE BRETAGNE pages 77 - 110 M. LABURTHE ET AL. 'Receptors for gut regulatory peptides.' see page 92, line 46 - page 95, line 21 see page 99, line 11 - line 37 --- | 7,8,12 |
| A | THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol.264, no.34, 5 December 1989, BALTIMORE MD, ÉTATS UNIS pages 20714 - 20717 B. AMIRANOFF ET AL. 'Galanin receptor in the rat pancreatic beta cell line Rin m 5F.' see abstract --- | 7,8,12 |
| A | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol.90, no.9, 1 May 1993, WASHINGTON DC, ÉTATS UNIS pages 3845 - 3849 Y. CHEN ET AL. 'Purification of a galanin receptor from pig brain.' cited in the application see abstract --- | 7,8,12 |
| A | WO,A,94 00590 (THE MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 6 January 1994 see claims see examples --- | 1-20 |
| P,X | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol.91, no.21, 11 October 1994, WASHINGTON DC, ÉTATS-UNIS pages 9780 - 9783 E. HABERT-ORTOLI ET AL. 'Molecular cloning of a functional human galanin receptor.' see the whole document ----- | 1-20 |
| 1 | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

| | |
|-----------|----------------|
| Internati | Application No |
| PCT/FR | 95/00172 |

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|----------------------------------------|------------------|-------------------------|---------|------------------|
| EP-A-0514361 | 19-11-92 | AU-A- | 1785892 | 30-12-92 |
| | | CZ-A- | 9302422 | 13-07-94 |
| | | DE-T- | 585300 | 16-06-94 |
| | | EP-A- | 0585300 | 09-03-94 |
| | | HU-A- | 65810 | 28-07-94 |
| | | JP-T- | 6507629 | 01-09-94 |
| | | NO-A- | 934098 | 12-11-93 |
| | | WO-A- | 9220709 | 26-11-92 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO-A-9215015 | 03-09-92 | AU-A- | 1462692 | 15-09-92 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO-A-9400590 | 06-01-94 | AU-B- | 4542793 | 24-01-94 |
| | | CA-A- | 2138999 | 06-01-94 |
| | | EP-A- | 0647275 | 12-04-95 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N°
PCT/FR 95/00172

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 6 C12N15/12 C07K14/72 C12N15/11 C12Q1/68 C12N5/10
 G01N33/74 C07K14/575 A61K38/22

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
 CIB 6 C12N C07K C12Q G01N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| X | EP,A,0 514 361 (AKTIEBOLAGET ASTRA) 19 Novembre 1992 voir revendications --- | 15-20 |
| X | WO,A,92 15015 (ZYMOGENETIC, INC. & THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIV. OF WASHINGTON) 3 Septembre 1992 voir revendications --- | 15-18 |
| X | BRAIN RESEARCH, vol.625, no.1, 15 Octobre 1993, AMSTERDAM, PAYS BAS pages 173 - 176 A. HULTING ET AL. 'Galanin receptors from human pituitary tumors assayed with human galanin as ligand.' voir le document en entier --- | 15-18 |

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant poser un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (tel que indiqué)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventrice par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventrice lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 Mai 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19.05.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nooij, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

| |
|---------------------------|
| Demande internationale No |
| PCT/FR 95/00172 |

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol.90, no.23, 1 Décembre 1993, WASHINGTON DC, ÉTATS UNIS pages 11287 - 11291 T. BARTFAI ET AL. 'Galanin-receptor ligand M40 peptide distinguishes between putative galanin-receptor subtypes.' voir abrégé</p> <p>---</p> | 15-18 |
| A | <p>BAILLIÈRE'S CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, vol.8, no.1, Janvier 1994, LONDRES, GRANDE BRETAGNE pages 77 - 110 M. LABURTHE ET AL. 'Receptors for gut regulatory peptides.' voir page 92, ligne 46 - page 95, ligne 21 voir page 99, ligne 11 - ligne 37</p> <p>---</p> | 7,8,12 |
| A | <p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol.264, no.34, 5 Décembre 1989, BALTIMORE MD, ÉTATS UNIS pages 20714 - 20717 B. AMIRANOFF ET AL. 'Galanin receptor in the rat pancreatic beta cell line Rin m 5F.' voir abrégé</p> <p>---</p> | 7,8,12 |
| A | <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol.90, no.9, 1 Mai 1993, WASHINGTON DC, ÉTATS UNIS pages 3845 - 3849 Y. CHEN ET AL. 'Purification of a galanin receptor from pig brain.' cité dans la demande voir abrégé</p> <p>---</p> | 7,8,12 |
| A | <p>WO,A,94 00590 (THE MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 6 Janvier 1994 voir revendications voir exemples</p> <p>---</p> | 1-20 |
| P,X | <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol.91, no.21, 11 Octobre 1994, WASHINGTON DC, ÉTATS-UNIS pages 9780 - 9783 E. HABERT-ORTOLI ET AL. 'Molecular cloning of a functional human galanin receptor.' voir le document en entier</p> <p>-----</p> | 1-20 |
| 1 | | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 95/00172

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|-------------------------------------------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| EP-A-0514361 | 19-11-92 | AU-A- 1785892 CZ-A- 9302422 DE-T- 585300 EP-A- 0585300 HU-A- 65810 JP-T- 6507629 NO-A- 934098 WO-A- 9220709 | 30-12-92 13-07-94 16-06-94 09-03-94 28-07-94 01-09-94 12-11-93 26-11-92 |
| ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO-A-9215015 | 03-09-92 | AU-A- 1462692 | 15-09-92 |
| ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO-A-9400590 | 06-01-94 | AU-B- 4542793 CA-A- 2138999 EP-A- 0647275 | 24-01-94 06-01-94 12-04-95 |
| ----- | ----- | ----- | ----- |